

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 29–38

Zum Einfluß von Hämolyse, Harnstoff und Bilirubin auf die Präzision radioimmunologischer Digoxin- und Insulin-Bestimmungen

Von A. Dwenger und I. Trautschold

unter Mitarbeit von Birgitt Nentwig, Gabriele Röllig und P. Tost

Aus der Abteilung für Klinische Biochemie des Zentrums Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 27. März/20. August 1981)

Zusammenfassung: Der Einfluß von Hämolyse, Urämie und Hyperbilirubinämie auf die radioimmunologischen Digoxin- und Insulin-Bestimmungen wird für jeweils fünf Trenntechniken (Dextran/Charcoal; Coated tube; Polyethylenglykol 4000; Natriumsulfit; Doppelantikörper-Methode) untersucht. Wiederfinderaten sowie intra- und interassay-Präzision werden ermittelt. Hierbei zeigt sich, daß auch in Serumproben mit hohen Hämolysegraden ($Hb \leq 50$ g/l) Digoxin nahezu störungsfrei bei Anwendung jeder der fünf Trenntechniken gemessen werden kann. Bei der Insulin-Bestimmung kommt es bei allen Trenntechniken im Bereich der sichtbaren Hämolyse ($Hb \geq 200$ mg/l) zu Störungen bzw. zu einem vollständigen Versagen des Tests. Dieser Einfluß kann unter deutlicher Verbesserung der Präzision durch N-Ethylmaleinimid weitgehend aufgehoben werden. Die intraassay-Präzision liegt mit Ausnahme der Coated tube-Trenntechnik unter 10% VK, die interassay-Präzision zwischen 10 und 20%. Ein störender Einfluß erhöhter Harnstoff-Konzentrationen wird bei der Digoxin-Bestimmung nur im Coated tube-Test beobachtet, bei der Insulin-Bestimmung dagegen im Coated tube- und im Doppelantikörper-Trennverfahren. Die intraassay-Präzision liegt ebenfalls bei Variationskoeffizienten bis 10%, die interassay-Präzision zwischen 10 und 20% VK. Bilirubin beeinflusst die Digoxin-Bestimmung mit Natriumsulfit-Trenntechnik und die Insulin-Bestimmung mit Polyethylenglykol 4000- und Natriumsulfit-Trenntechniken. Die intra- und interassay-Präzisionswerte liegen jedoch auch hierbei mit Ausnahme des Coated tube-Verfahrens unter 10% bzw. zwischen 10 und 20% VK.

Im Vergleich zu der für Poolserum von Blutspendern ermittelten interassay-Präzision von 15% VK für die Digoxin- und von 13% VK für die Insulin-Bestimmungen verschlechtern die drei untersuchten Störfaktoren Hämolyse, Harnstoff und Bilirubin die interassay-Präzision nur unwesentlich.

Effects of haemolysis, urea and bilirubin on the precision of digoxin and insulin radioimmunoassays

Summary: The influence of haemolysis, uraemia and hyperbilirubinaemia on the radioimmunoassay for both digoxin and insulin has been investigated for five separation techniques (dextran/charcoal; coated tube; polyethyleneglycol 4000; sodium sulphite; double antibody). Recoveries, and intra- and interassay precision were calculated. It was demonstrated that even in serum samples with a rather high degree of haemolysis (haemoglobin up to 50 g/l) digoxin can be measured by using each of the five separation techniques without any significant interference. Visible haemolysis (haemoglobin above 200 mg/l) leads either to disturbance or to a complete failure of insulin radioimmunoassays with all separation techniques. This effect can be largely neutralized, and precision improved, by using N-ethylmaleimide. With the exception of the coated tube separation technique the intraassay precision has a CV of $< 10\%$, and the interassay CV is between 10 and 20%. Elevated urea concentrations interfered in the digoxin radioimmunoassay only when the coated tube technique was used. The insulin radioimmunoassay, however was affected by high urea when either the double antibody or the coated tube technique was used. Here the intraassay precision also has a coefficient of variation $< 10\%$, the interassay CV lying between 10 and 20%. Bilirubin influenced the digoxin test when the sodium sulphite separation was used, and it affected the insulin determinations with polyethyleneglycol 4000 and sodium sulphite. The intra- and interassay precision were however also around 10% and between 10 and 20% respectively. Compared with the interassay precision of 15% CV for digoxin and 13% for insulin for a pool-serum from blood donors, the decrease of interassay precision caused by haemolysis, uraemia and hyperbilirubinaemia was insignificant.

Einführung

Das generelle Ziel von Untersuchungen zur Qualitätskontrolle radioimmunologischer Verfahren ist es, eine Verbesserung von Präzision und Richtigkeit dieser Verfahren zu erreichen und die Sicherheit der klinischen Diagnostik zu erhöhen. Diese Versuche werden in der Bundesrepublik Deutschland seit einigen Jahren vom Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn, vom Institut für Standardisierung und Dokumentation Düsseldorf sowie einer Endokrinologischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München durchgeführt (1–15). Auf internationaler Ebene befaßt sich die WHO seit 1976 weltweit mit der Standardisierung und Qualitätskontrolle radioimmunologischer Hormonanalysen (16–18). Von den beiden erstgenannten Institutionen werden externe Qualitätskontrollversuche für einige Hormone in einem der Evaluation sonstiger klinisch-chemischer Kenngrößen analogen Vorgehen in freiwilliger Teilnahme durchgeführt. Da hierbei jedoch nur zwei Proben untersucht werden, sind Information und Analyse möglicher Fehlerquellen eingeschränkt. Die Münchner Arbeitsgruppe führt Versuche zur externen Qualitätskontrolle nach eigenem Modell durch, bei dem eine größere Probenzahl untersucht wird, wobei entsprechend Art und Menge der Proben weitergehendere Informationen zu

Besonderheiten von Testsystemen und deren Beeinflussbarkeit ermittelt und in Empfehlungen zu Testverbesserungen umgesetzt werden können. Auch für das Nihthormon Digoxin wurden Ringversuche nach beiden Modellen durchgeführt (19–22). Die WHO verwendet zur Qualitätskontrolle radioimmunologischer Hormonbestimmungen das aufwendigste Verfahren ("matched reagents programme"), bei dem den Teilnehmern Reagenziensätze und Arbeitsanleitungen permanent zur Verfügung gestellt werden. Es ist hierbei das Ziel, eine möglichst stabile und wenig störanfällige Methode für jedes Antigen herauszufinden, um sie dann als jeweilige Referenzmethode zu deklarieren (17, 18).

Aufgrund der Komplexität des radioimmunologischen Gesamtanalysenablaufs kann in Ringversuchen mit nur wenigen Proben anhand des Vergleichs der Ergebnisse mit dem wahrscheinlichsten Wert oder dem Referenzwert nur das Ausmaß der Abweichung festgestellt werden, nicht aber ihre Ursache, da sie an unterschiedlichen Stellen in der Abfolge der Teilprozesse des Gesamtablaufs lokalisiert sein kann. Einige der Faktoren, die durch ihren Einfluß auf Teilschritte oder Bestandteile einer radioimmunologischen Methode zu Ergebnisdifferenzen führen können, sind bekannt, weitere können lediglich vermutet werden oder sind unbekannt. Eine Aufstellung hierzu gibt Tabelle 1. Die Ergebnisse ver-

Tab. 1. Einflußgrößen, die bei radioimmunologischen Verfahren zu Resultatsunterschieden führen können.

Bestandteil oder Teilschritt einer radioimmunologischen Methode	Variable Faktoren, die zu Resultatsunterschieden führen können
1. Reagenzien	
Standard-Antigen	Struktur, Reinheit, Stabilität, Proteinbindung
Markiertes Antigen	Art der Markierung, spezifische Radioaktivität, Stabilität, physikalisch-chemische Eigenschaften im Vergleich zum Standard-Antigen
Antikörper	Spezies, Art des Immunogens, Immunisierungsschema, Affinitätskonstante gegenüber markiertem und unmarkiertem Antigen
Puffersystem	Zusammensetzung, Ionenstärke, pH-Wert, Art und Konzentration des Schutzproteins, Zusätze weiterer Reagenzien (z. B. Natriumazid, Enzyminhibitoren, Substanzen zur Verhinderung einer Protein-Antigen-Wechselwirkung)
Standard-Matrix	Zusammensetzung
2. Probenmatrix	Zusammensetzung (unphysiologische Konzentration physiologischer Bestandteile, unterschiedliche Konzentrationen unphysiologischer Bestandteile)
3. Probenvorbereitung	Gewinnung, Lagerung, Versand, Vorbehandlung (Extraktion, Hitzebehandlung, Gerinnungshemmung u. a.)
4. Dosierung und Verdünnung	Qualität von Dosierern bzw. mechanisierten Systemen, Materialien
5. Reaktionsgefäße	Material, Oberflächen/Volumen-Verhältnis
6. Inkubation	Temperatur, Zeit
7. Trenntechnik	Art der b/f-Trennung, Einflüsse durch Komponenten der Probenmatrix, unspezifische Bindungen
8. Radioaktivitätsmessung	Art und Qualität des Meßgerätes, statistischer Zählfehler
9. Auswertung	Art und Qualität des Angleichverfahrens für die Standardkurve, individuelle unspezifische Bindungen

schiedener Ringversuche (11, 14, 19) zeigten, daß die Interlaboratoriums-Präzision für Proben auf Humanserum-Basis mit physiologischer Zusammensetzung der Komponenten auffällig besser ist als für Proben, die physiologische Bestandteile in unphysiologischer Konzentration oder unphysiologische Bestandteile in unterschiedlicher Konzentration enthalten. Als Beispiel hierfür dient das Präzisionsprofil aus einem Digoxin-Ringversuch (19), in dem die Interlaboratoriums- bzw. inter-assay-Präzision für derartige Typen von Serumproben verglichen wird (Abb. 1).

Bei Interlaboratoriumsvergleichen durch Ringversuche können alle in Tabelle 1 genannten Faktoren durch ihren individuellen Einfluß auf unterschiedliche Testverfahren zur Verschlechterung der Interlaboratoriums-Präzision beitragen. Die Entwicklung auf dem Gebiet der Zuverlässigkeit radioimmunologischer Verfahren hat gezeigt, daß ein kontinuierlicher Mehraufwand an Untersuchungs-Material und -Methodik notwendig ist, um eine wirksame Verfahrens-Evaluation durchzuführen, wobei auch ein derart umfangreiches Programm wie das der WHO nur eine begrenzte Anzahl von Probenotypen und damit auch Störfaktoren untersuchen kann. Weitere Informationen zur Störanfälligkeit von Testverfahren kann man erhalten und eventuell auch bei der Ermittlung robuster Methoden berücksichtigen, wenn in systematischen Untersuchungen an exemplarischen radioimmunologischen Verfahren festgestellt wird, welche potentiellen Störfaktoren bei definierten Methoden zu groben

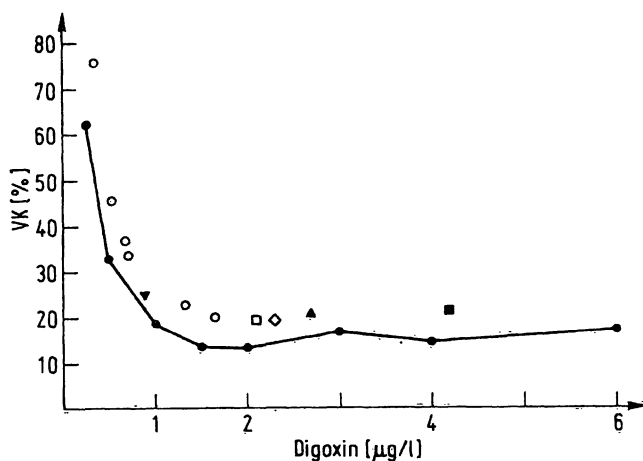


Abb. 1. Interlaboratoriums-Präzision der radioimmunologischen Digoxin-Bestimmung, ermittelt aus Daten eines Ringversuchs (19) mit 54 Methoden. Variationskoeffizienten (%) in Abhängigkeit von der Digoxin-Konzentration in Serumproben mit physiologischer und unphysiologischer Zusammensetzung.

- Poolserumproben mit zugesetztem Digoxin
- Serumproben aus einer pharmakokinetischen Untersuchung
- Hämolytische Serumprobe
- ▲ Serumprobe mit unphysiologischer Proteinzusammensetzung
- ◇ Serumprobe mit erhöhter Lipidkonzentration
- ▼ Kontrollserum 1
- Kontrollserum 2

Abweichungen führen, die dann als Referenzmethoden zu wenig robust sind. Dieses ist anhand ausgewählter repräsentativer Methoden möglich, bei denen bis auf die zu untersuchenden Variablen weitere Parameter konstant gehalten werden können. Aus der Gruppe potentieller Teststörungen, die durch eine von humanem Spenderserum abweichende Probenmatrix-Zusammensetzung hervorgerufen werden können, werden die Einflüsse von Hämolyse, Harnstoff und Bilirubin auf jeweils fünf radioimmunologische Methoden zur Bestimmung eines Steroidhaptens (Digoxin) und eines Peptidantigens (Insulin) untersucht.

Material und Methoden

Verwendete Reagenzien und Lösungen

E. Merck: 5,5-Diethylbarbitursäure Natriumsalz, zur Analyse; Natriumacetat, krist., zur Analyse; Natriumchlorid, krist., zur Analyse; Natriumazid; Natriumsulfit, wasserfrei, rein; Aktivkohle zur Analyse; Harnstoff zur Analyse; Bilirubin für biochemische Zwecke.

Sigma: N-Ethylmaleinimid.

Serva: Albumin aus Rinderserum lyophil. rein, 92% min.; Immunglobulin aus Rinderserum lyophil. rein 98%; Aktivkohle aus Holz Norit A.

Fluka AG: Dextran MG 80000 purum.

Merck-Schuchardt: Polyethylenglykol 4000 zur Synthese.

Hoffmann-La Roche: Liquemin 25000, Natrium-heparinat.

Hoechst AG: Insulin vom Schwein, 125 I-markiert, spezifische Aktivität 6,475 GBq/mg (175 mCi/mg), lyophil. getrocknet.

Boehringer/Mannheim: Antikörperbeschichtete Reaktionsgefäße aus der Testkombination zur radioimmunologischen Insulinbestimmung; antikörperbeschichtete Reaktionsgefäße aus der Testkombination zur radioimmunologischen Digoxin-Bestimmung; Digoxin- 125 I-Derivat, spezifische Aktivität 18,5 GBq/mg (500 mCi/mg); Digoxin, reinst.

Calbiochem-Behring Corp.: Immunglobulin, guinea pig, sheep antibody to, lyophilized; Immunglobulin, rabbit, goat antibody to, lyophilized; serum, normal rabbit, lyophilized, B grade.

Novo: Insulin vom Schwein, 10 × krist., 1 mg = 25 IE.

Meerschweinchen

Meerschweinchen wird in Ethernarkose Blut durch Herzpunktion entnommen und nach Gerinnung Serum gewonnen.

Pufferlösung 1

5,5-Diethylbarbitursäure Natriumsalz 7,13 mmol/l; Natriumacetat 11,8 mmol/l; Natriumchlorid 138 mmol/l; Natriumazid 15,4 mmol/l; Albumin aus Rinderserum 5 g/l; pH 7,4.

Pufferlösung 2

Pufferlösung 1 mit 15 g/l Immunglobulin aus Rinderserum.

Pufferlösung 3

Pufferlösung 1 ohne Albumin.

Insulin-Antikörper

Anti-Schweineinsulin-Serum vom Meerschweinchen.

Digoxin-Antikörper

Anti-Digoxin-Serum vom Kaninchen. Bei Antiserum-Verdünnungen von 1:250 000 (Digoxin) und 1:250 000 (Insulin) im Testansatz wird unter Verwendung von Polyethylenglykol 4000 als Trennmittel (175 g/l Endkonzentration) in 20 Stunden bei

4 °C und bei Einsatz von 10000 Imp/min (Digoxin) bzw. 15000 Imp/min (Insulin) pro Testansatz jeweils die Hälfte des markierten Antigens spezifisch gebunden.

Digoxin-Tracerlösungen

¹²⁵I-Digoxin-Derivat mit einer spezifischen Radioaktivität von 18,5 GBq/mg (500 mCi/mg). Hieraus werden Lösungen mit 10000 Imp/min · 100 µl Pufferlösung 1 (Trenntechnik Polyethylenglykol 4000; Dextran/Charcoal; Natriumsulfit; Coated tube) und mit 10000 Imp/min · 100 µl Pufferlösung 1 und 40 µl Kaninchenserum pro ml Tracerlösung (Trenntechnik Doppelantikörper) hergestellt.

Insulin-Tracerlösungen

[¹²⁵I]Insulin vom Schwein mit einer spezifischen Radioaktivität von 6,475 GBq/mg (175 mCi/mg). Hieraus werden Lösungen mit 15000 Imp/min · 100 µl Pufferlösung 1 (Trenntechnik Polyethylenglykol 4000; Dextran/Charcoal; Natriumsulfit), mit 15000 Imp/min · 100 µl Pufferlösung 1 und 40 µl Meerschweinchenserum pro ml Tracerlösung (Trenntechnik Doppelantikörper) und mit 20000 Imp/min · 1000 µl Pufferlösung 1 (Trenntechnik Coated tube) hergestellt.

Digoxin-Standards

Durch Lösen von Digoxin in einer ethanolischen Lösung (12 mmol/l Ethanol im Wasser) wird eine Lösung mit der Digoxin-Konzentration 1 g/l hergestellt, mit Pufferlösung 1 auf 10 mg/l und mit Poolserum männlicher Blutspender auf 4, 2, 1 und 0,5 µg/l verdünnt.

Insulin-Standards

10x krist. Schweineinsulin wird in 0,03 mol/l HCl gelöst, mit Pufferlösung 1 auf 100 E/l und mit insulinarmem Serum auf 160, 80, 40 und 20 mE/l verdünnt.

Probenvorbereitung

Als Matrices zur Herstellung von Standards und Proben werden Poolserum männlicher Blutspender (Digoxin-Bestimmungen) und ein insulinarmes Poolserum (Insulin-Bestimmungen) verwendet. Die Entfernung von Insulin aus Poolserum erfolgt durch 18-stündiges Rühren einer Suspension von 200 g Aktivkohle (Norit A) pro Liter Serum bei 4 °C, 8-stündige Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C und Filtration durch Glaswolle (23). Unter Bezug auf Insulin-Standards in Pufferlösung 2 und bei Anwendung der Polyethylenglykol 4000-Trenntechnik läßt sich in Wiederfinderversuchen durch Korrelation von zugesetztem und wiedergefundenem Insulin durch lineare Regression eine Erniedrigung der Insulinkonzentration in Poolserum mit diesem Verfahren von 21,3 auf 0,9 mE/l ermitteln.

Hämolyse/N-Ethylmaleinimid

Zur Herstellung eines Hämolsats wird heparinisierter Spenderblut (Heparin-Natrium 75000 E/l Blut) 10 min bei 1000 g zentrifugiert, das Plasma verworfen, die zellulären Bestandteile zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, dreimal tiefgefroren und aufgetaut. Durch Zusatz des Hämolsats (Hb 350 g/l) zu Poolserum werden Proben mit Hämoglobin-Konzentrationen von 0,005–50 g/l hergestellt. Die Hämoglobin-Konzentration wird mit Hilfe der Methämoglobincyanid-Methode mit einer modifizierten Drabkin-Lösung ermittelt (24, 25). Durch Lösen von N-Ethylmaleinimid in Poolserum wird eine Lösung mit einer Konzentration von 60 mmol/l hergestellt, aus der durch Zugabe von Hämolsat Proben mit Hb-Konzentrationen zwischen 0,005 und 27 g/l resultieren.

N-Ethylmaleinimid

Durch Lösen von N-Ethylmaleinimid in Poolserum und Verdünnen mit Poolserum werden Serumproben mit N-Ethylmaleinimid-Konzentrationen zwischen 12,5 und 100 mmol/l hergestellt.

Harnstoff

Wäßrige Harnstofflösung mit einer Konzentration von 10 mol/l wird Spenderserum zugesetzt, so daß Serumproben mit zuge-

setzten Harnstoff-Konzentrationen zwischen 10 und 80 mmol/l resultieren.

Bilirubin

12 mg Bilirubin werden mit 50 µl 1 mol/l NaOH intensiv gemischt und nach Zugabe von 950 µl Poolserum bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Diese Lösung wird Poolserum zugesetzt, wobei Serumproben mit zugesetzten Bilirubin-Konzentrationen zwischen 30 und 977 µmol/l resultieren.

Durchführung der Tests

Zusammensetzungen und Testbedingungen für Digoxin- und Insulin- (in Klammern) Bestimmungen mit Trenntechniken Polyethylenglykol 4000, Dextran/Charcoal, Natriumsulfit und Doppelantikörper

Die Proben zur Bestimmung der Gesamt-Tracerbindung (B_0), Tracerbindung in Gegenwart der Standards (BSt), unspezifischen Tracerbindung der Standardkurvenansätze (UBSt), Tracerbindung in Gegenwart der Probe (BPr), Tracerbindung in Gegenwart von Probe und Antigenzusatz (B + Pr) und unspezifische Tracerbindung der Probenansätze (UBPr) werden jeweils in Triplikaten angesetzt. Volumenangaben in µl.

	Standardkurve			Proben		
	B_0	BSt	UBSt	BPr	B + Pr	UBPr
Standard/Probe	–	50	–	50	50	50
Poolserum (insulinarmes Serum)	50 (50)	–	50 (50)	–	–	–
Tracerlösung	100	100	100	100	100	100
Pufferlösung 1	50	50	–	50	–	–
1 µg/l Pufferlösung 1 (50 mE/l Pufferlösung 1)	–	–	–	–	50 (50)	–
10 mg/l Pufferlösung 1 (100 E/l Pufferlösung 1)	–	–	50 (50)	–	–	50 (50)
Antikörperlösung	50	50	50	50	50	50

Testzusammensetzungen für Digoxin- und Insulin- (in Klammern) Bestimmungen mit der Coated tube-Technik

	Standardkurve			Proben		
	B_0	BSt	UBSt	BPr	B + Pr	UBPr
Standard/Probe	–	100	–	100	100	100
Poolserum (insulinarmes Serum)	100 (100)	–	100	–	–	–
Tracerlösung	500 (1000)	500 (1000)	500 (1000)	500 (1000)	500 (1000)	500 (1000)
Pufferlösung 1	100	100	–	100	–	–
1 µg/l Pufferlösung 1 (50 mE/l Pufferlösung 1)	–	–	–	–	100 (100)	–
10 mg/l Pufferlösung 1 (100 E/l Pufferlösung 1)	–	–	100 (100)	–	–	100 (100)

Für die Coated tube-Technik werden die Reaktionsansätze zur Digoxin-Bestimmung 2 Stunden bei Raumtemperatur, diejenigen zur Insulin-Bestimmung 16–20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, der Inhalt wird abgesaugt und die Gefäße werden einmal mit Leitungswasser gespült.

Alle anderen Reaktionsansätze werden 16–20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach halbstündigem Stehen bei Raumtemperatur erfolgt die Zugabe von 500 µl Trennreagenz (Polyethylenglykol 4000, 263 g/l; Dextran/Charcoal in Pufferlösung 3, 1,25/12,5 g/l; zweiter Antikörper in optimaler Verdünnung in Pufferlösung 1), Mischen und Stehenlassen für 2 min (Dextran/Charcoal), 10 min (Polyethylenglykol 4000; Natriumsulfit) bzw. 2 Stunden (Doppelantikörper) bei Raumtemperatur. Es wird 10 min bei 2000 g zentrifugiert, 600 µl Überstands-Aliquot mit einem automatischen Verdünnungsgerät abgenommen und die gebundene Radioaktivität oder die gebundene und die freie Radioaktivität bis zu einer Impulssumme von 10000 Imp/min gemessen.

Berechnung

Die Berechnung der Konzentrationen in den Proben erfolgt mit Hilfe der geglätteten Spline-Approximation (26, 27) an einem HP 9835 A-Rechnersystem, wobei eine individuelle Korrektur für die unspezifische Bindung erfolgt (28). Die Berechnung von spezifischer (B) und unspezifischer (UB) Bindung erfolgt für die unterschiedlichen Trenntechniken nach:

$$\%B \text{ bzw. } \%UB = \left(1 - \frac{\text{Imp/min}\bar{U} \cdot F}{\text{Imp/min}\bar{U} + \text{Imp/min}S}\right) \cdot 100$$

für Trenntechniken Polyethylenglykol 4000, Natriumsulfit, Doppelantikörper

$$\%B \text{ bzw. } \%UB = \left(\frac{\text{Imp/min}\bar{U} \cdot F}{\text{Imp/min}\bar{U} + \text{Imp/min}S}\right) \cdot 100$$

für Trenntechnik Dextran/Charcoal

$$\%B \text{ bzw. } \%UB = \left(\frac{\text{Imp/min gebunden}}{\text{Imp/min total}}\right) \cdot 100$$

für Trenntechnik Coated tube

$$F = \frac{\text{Gesamt volumen}}{\text{abgenommenes Aliquot-Volumen}}$$

Imp/min \bar{U} = Radioaktivität des Überstands-Aliquots

Imp/min S = Radioaktivität des Sediments + Restüberstand

Der Faktor F wird entweder durch Wägung ermittelt oder aber in Reaktionsansätzen, denen anstelle des jeweiligen Trennmittels ein identisches Volumen Wasser zugesetzt wird.

Aus den Konzentrationswerten für die Probe mit und ohne Antigen- bzw. Hapten-Zusatz wird die Wiederfindung berechnet.

Die intraassay-Präzision wird als Variationskoeffizient berechnet aus Mittelwert und Standardabweichung aller Einzelwerte der mit einer Trenntechnik bei allen Proben des entsprechenden Typus von Störeinfluß ermittelten Konzentrationen.

Die interassay-Präzision wird als Variationskoeffizient berechnet aus Mittelwert und Standardabweichung aller Einzelwerte der mit 5 Trenntechniken bei einer Probe des entsprechenden Typus von Störeinfluß ermittelten Konzentrationen.

Ergebnisse und Diskussion

Bei radioimmunologischen Bestimmungen sind die ermittelten Konzentrationswerte die Resultante aus spezifischen und unspezifischen Bindungen bzw. Effekten. Weil darüberhinaus im Verhalten der unspezifischen Bindungen auch Einflüsse auf das Testsystem erkannt werden können, die außerhalb der eigentlichen Antigen-Antikörper-Reaktion liegen, werden beide Kenngrößen

in Abhängigkeit der jeweiligen Variablen separat dargestellt: die spezifische Bindung als % Bindung oder % Wiederfindung, die unspezifische Bindung als % Bindung.

Hämolyse/Digoxin

Den Einfluß von Hämolyse auf die radioimmunologische Digoxin-Bestimmung gibt Abbildung 2 wieder. (Das Ausmaß an Hämolyse wird durch die Konzentration an freiem Hämoglobin angegeben; ab etwa 200 mg/l wird Hämolyse sichtbar). Mit Ausnahme der Doppelantikörper-Trenntechnik, bei der es erst bei extrem hohen Hb-Konzentrationen zu einer falsch positiven Wiederfindung kommt, hat Hämolyse bis hin zu hohen Hämolysegraden weder Einfluß auf die Wiederfindung noch auf die unspezifische Bindung bei den vier weiteren Trenntechniken. Der Vergleich der intraassay-Präzision für Hb-Konzentrationen von 0–200 mg/l und 200–10000 mg/l zeigt eine geringfügige Verschlechterung im Bereich der sichtbaren und starken Hämolyse an (Tab. 2), die interassay-Präzisionsdaten lassen keinen deutlichen Einfluß mit zunehmender Hämolyse erkennen (Tab. 3).

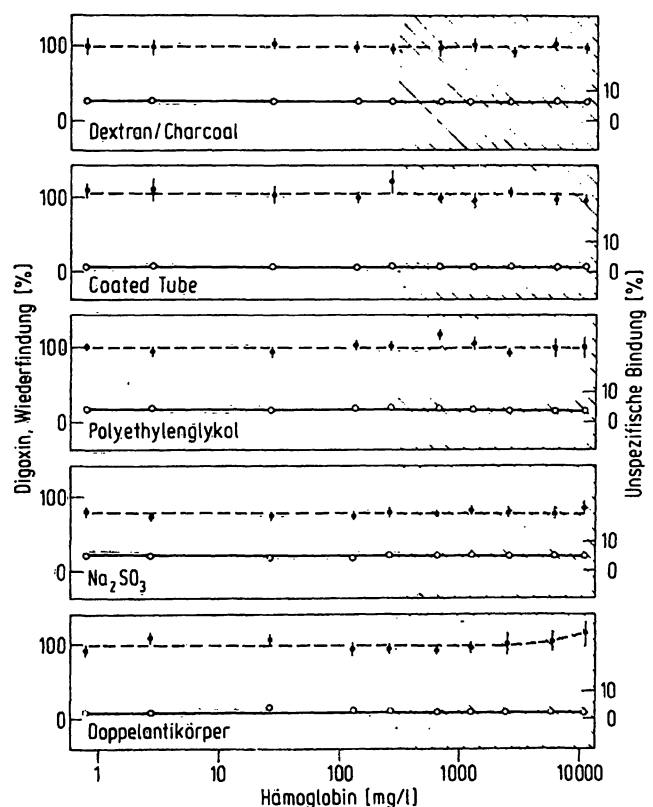


Abb. 2. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Digoxin-Bestimmung in Abhängigkeit von der Hämoglobin-Konzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)

rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)

Abszisse: Hämoglobin-Konzentration in mg/l Testansatz

schraffierter Bereich: sichtbare bis starke Hämolyse

Tab. 2. Intraassay-Präzision radioimmunologischer Digoxin- und Insulin-Bestimmungen in Abwesenheit und in Gegenwart von N-Ethylmaleinimid (12 mmol/l Testansatz) bei geringer (Hb; 0–200 mg/l) und bei starker (Hb; 200–10000 mg/l) Hämolyse. VK (%) aus $\bar{x} \pm s$ bei $n = 15$.

Trenntechniken	Digoxin		Insulin		Insulin/ N-Ethylmaleinimid	
	Hb (mg/l)		Hb (mg/l)		Hb (mg/l)	
	0–200	200–10000	0–200	200–10000	0–200	200–10000
Dextran/Charcoal	6,4	8,4	6,8	> 43	8,3	8,7
Coated tube	12,2	8,4	14,2	> 50	18,4	13,9
Polyethylenglykol 4000	6,5	10,8	5,3	> 30	8,4	21,5
Natriumsulfit	7,7	7,9	5,8	> 44	8,9	14,4
Doppelantikörper	10,3	17,5	10,9	> 28	8,2	23,5

Tab. 3. Interassay-Präzision radioimmunologischer Digoxin- und Insulin-Bestimmungen (Trenntechniken: Dextran/Charcoal; Coated tube; Polyethylenglykol 4000; Natriumsulfit; Doppelantikörper) in Abwesenheit und in Gegenwart von N-Ethylmaleinimid (12 mmol/l Testansatz) und in Abhängigkeit vom Hämolysegrad (Hb; mg/l Testansatz) VK (%) aus $\bar{x} \pm s$ bei $n = 15$.

Hämoglobinkonzentration (mg/l)	Digoxin	Insulin	Insulin/ N-Ethylmaleinimid
0,8	11,5	15,8	5,6
2,6	16,5	15,2	7,6
25	15,0	15,4	14,6
128	10,7	15,1	18,1
257	14,8	11,1	12,7
630	16,2	> 14,5	13,8
1230	13,0	> 32,0	18,4
2450	11,9	> 38,0	18,0
5960	16,6	—	24,8
10600	20,7	—	—

Hämolyse/Insulin

Der Einfluß zunehmender Hämolyse auf die Insulin-Bestimmung insbesondere im Gebiet der sichtbaren Hämolyse geht aus den drastischen Veränderungen der Wiederfinderaten (Abb. 3), der Verschlechterung der intraassay-Präzision (Tab. 2) sowie der interassay-Präzision (Tab. 3) hervor. Auch die unspezifischen Bindungen zeigen einen Einfluß auf den Test an. Insbesondere der Anstieg der unspezifischen Bindung bei der Trenntechnik Dextran/Charcoal zeigt, daß innerhalb der 16–20stündigen Inkubationszeit ein vom Hämolysegrad abhängiger Abbau zu Produkten provoziert wird, die in ihrem Adsorptionsverhalten gegenüber Dextran/Charcoal den durch Alterung 125 Iod-markierten Insulins entste-

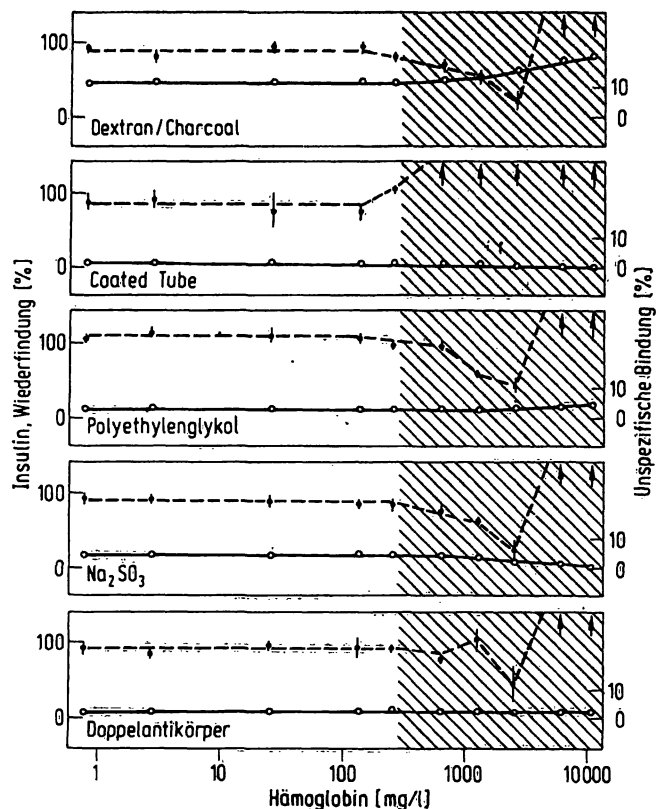


Abb. 3. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Insulin-Bestimmung in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)
rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)
Abszisse: Hämoglobinkonzentration in mg/l Testansatz
schraffierter Bereich: sichtbare bis starke Hämolyse

henden Radiolyseprodukten ähneln (28). Der durch ein erythrocytäres Enzym verursachte Abbau, der sowohl unmarkiertes wie auch markiertes Insulin betrifft, kann durch N-Ethylmaleinimid gehemmt werden (29, 30). In Anwesenheit einer auch für den höchsten Hämolysegrad zur Enzymhemmung ausreichenden N-Ethylmaleinimid-Konzentration von 12 mmol/l Testansatz wird im Bereich der sichtbaren und starken Hämolyse eine außerordentliche Verbesserung der intraassay-Präzision erreicht (Abb. 4, Tab. 2), die interassay-Präzision ist im Vergleich zu derjenigen in Abwesenheit von N-Ethylmaleinimid bis zu höheren Hämolysegraden besser (Tab. 3). Um auszuschließen, daß N-Ethylmaleinimid in der angewandten Konzentration selbst einen Einfluß auf die Antigen-Antikörper-Bindung und/oder auf die unspezifische Bindung ausübt, werden beide Parameter in Abhängigkeit von der N-Ethylmaleinimid-Konzentration für die fünf Trenntechniken untersucht. Hierbei zeigt sich, daß erst N-Ethylmaleinimid-Konzentrationen > 15 mmol/l bei drei Trenntechniken (Dextran/Charcoal; Polyethylenglykol 4000; Doppelantikörper) zu einer geringfügigen Abnahme der spezifischen Bindung führen.

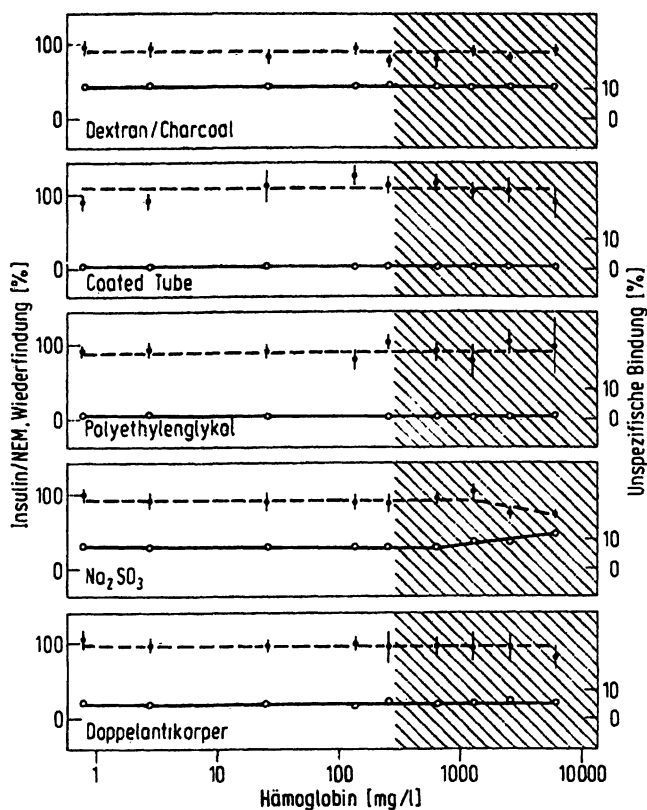


Abb. 4. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Insulin-Bestimmung in Gegenwart von N-Ethylmaleinimid 12 mmol/l Testansatz in Abhängigkeit von der Hämoglobin-Konzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)
rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)
Abszisse: Hämoglobin-Konzentration in mg/l Testansatz
schraffierter Bereich: sichtbare bis starke Hämolyse

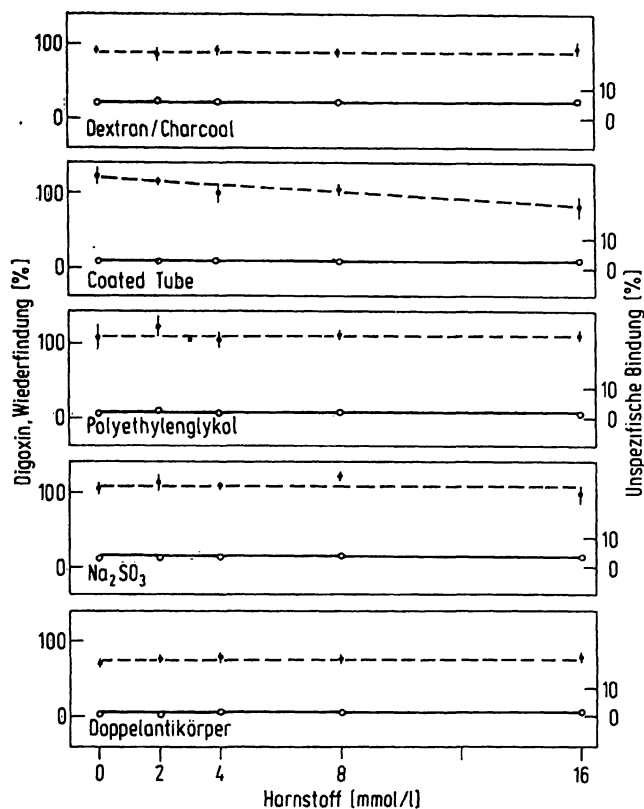


Abb. 5. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Digoxin-Bestimmung in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)
rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)
Abszisse: Harnstoff-Konzentration in mmol/l Testansatz zugesetzt

Harnstoff/Digoxin

Harnstoff-Konzentrationen bis zu 16 mmol/l Testansatz entsprechend 80 mmol/l Serum bzw. Plasma bewirken bei der Coated tube-Trenntechnik eine Abnahme der Wiederfindung, die weiteren Verfahren bleiben uneinflusst (Abb. 5). Analog den Ergebnissen aus den Untersuchungen zum Einfluß der Hämolyse liegt die intraassay-Präzision im Mittel unter 10% VK, die interassay-Präzision zwischen 10 und 20% VK (Tab. 4 und 5).

Harnstoff/Insulin

Bei der Insulin-Bestimmung führen höhere Harnstoff-Konzentrationen zu einem geringen Anstieg der Wiederfindung beim Coated tube-Verfahren, zu einem Abfall bei der Doppelantikörper-Trenntechnik (Abb. 6). Die intraassay-Präzisionsdaten für diese beiden Trenntechniken sind im Vergleich zu denen für die weiteren Trenntechniken schlechter (Tab. 4), die interassay-Präzision nimmt mit zunehmender Harnstoff-Konzentration ab (Tab. 5).

Tab. 4. Intraassay-Präzision radioimmunologischer Digoxin- und Insulin-Bestimmungen bei Zusatz von Harnstoff (0–16 mmol/l) bzw. Bilirubin (0–195 μ mol/l) VK (%) aus $\bar{x} \pm s$ bei $n = 15$.

Trenntechniken	Digoxin		Insulin	
	Harnstoff	Bilirubin	Harnstoff	Bilirubin
Dextran/Charcoal	5,8	7,5	10,0	8,0
Coated tube	18,2	16,1	12,2	23,6
Polyethylenglykol 4000	9,3	9,2	9,6	12,5
Natriumsulfit	9,7	14,9	8,2	8,5
Doppelantikörper	6,3	7,6	20,8	11,9

Bilirubin/Digoxin

Steigende Bilirubin-Konzentrationen führen bei der Natriumsulfit-Trenntechnik zu einem Anstieg der Wiederfindung (Abb. 7), der durch den parallelen Anstieg der unspezifischen Bindungen erklärt werden kann. Bei individueller Korrektur für die unspezifischen Bindun-

Tab. 5. Interassay-Präzision radioimmunologischer Digoxin- und Insulin-Bestimmungen (Trenntechniken: Dextran/Charcoal; Coated tube; Polyethylenglykol 4000; Natriumsulfit; Doppelantikörper) in Abhängigkeit von der Harnstoff- bzw. Bilirubin-Konzentration. VK (%) aus $\bar{x} \pm s$ bei $n = 15$.

Harnstoff zugesetzt (mmol/l)	Digoxin	Insulin	Bilirubin zugesetzt ($\mu\text{mol/l}$)	Digoxin	Insulin
0	18,9	7,5	0	12,8	19,3
2	20,6	10,0	6	19,2	18,4
4	12,7	12,2	24	16,0	19,1
8	16,7	12,8	49	16,6	20,4
16	15,6	23,1	98	17,9	19,2
			195	22,9	20,3

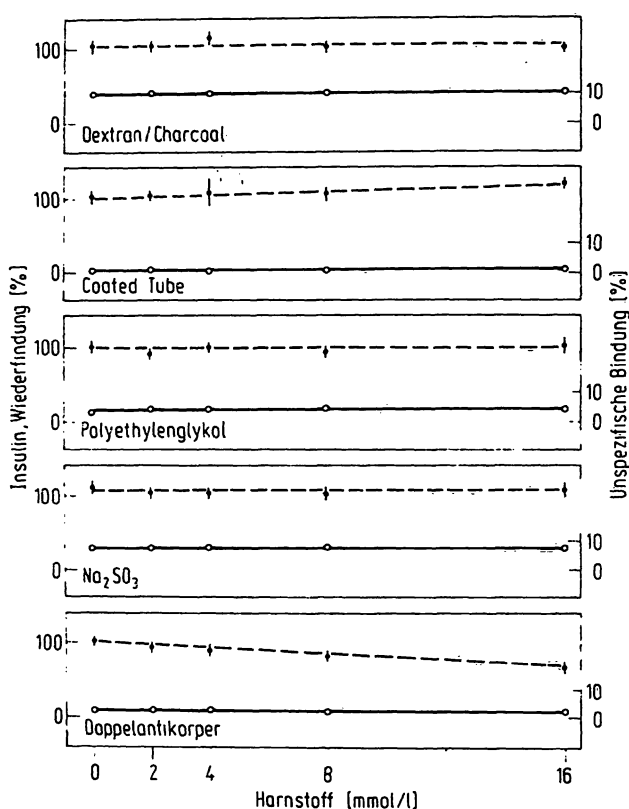


Abb. 6. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Insulin-Bestimmung in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)
rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)
Abszisse: Harnstoff-Konzentration in mmol/l Testansatz zugesetzt

gen und bei der Berechnung der Wiederfindung aus der Differenz der ermittelten Konzentrationswerte mit und ohne Antigenzusatz steigen bei steigender unspezifischer Bindung die Konzentrationswerte mit Antigenzusatz stärker an als diejenigen ohne Antigenzusatz, so daß die hierdurch steigenden Differenzen zu erhöhten Wieder-

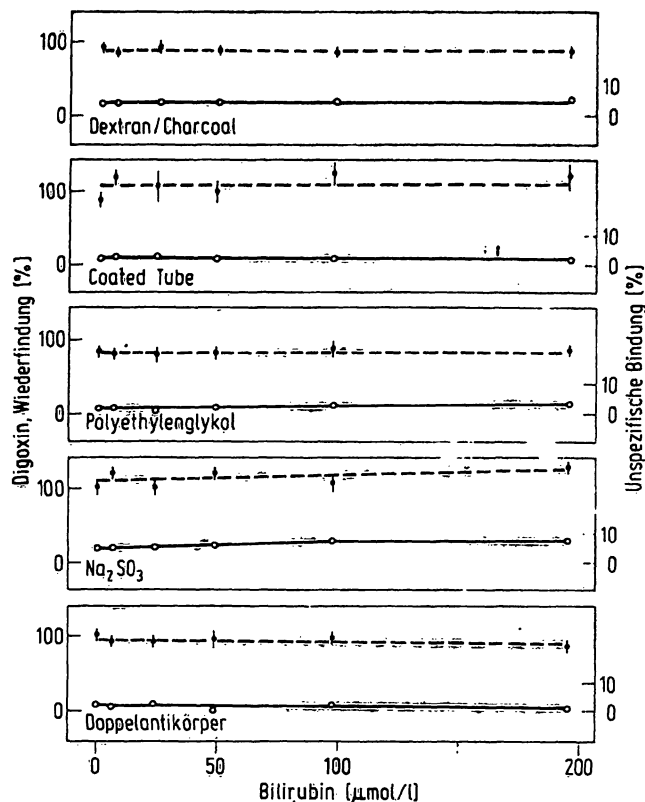


Abb. 7. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Digoxin-Bestimmung in Abhängigkeit von der Bilirubin-Konzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)
rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)
Abszisse: Bilirubin-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ Testansatz zugesetzt

finderaten führen. Die intraassay- und interassay-Präzisionsdaten entsprechen denjenigen aus den Untersuchungen zum Einfluß von Hämolyse bzw. Harnstoff (Tab. 4 und 5).

Bilirubin/Insulin

Bei der Insulin-Bestimmung mit Polyethylenglykol 4000-Trenntechnik erhöht Bilirubin geringfügig die Wiederfindung und erniedrigt sie im Falle der Natriumsulfit-Trenntechnik (Abb. 8). Die intraassay-Präzisionsdaten für die Insulin-Bestimmung sind wie auch bei den Untersuchungen des Einflusses von Hämolyse und Harnstoff schlechter als diejenigen der Digoxin-Bestimmung, die interassay-Präzision ist schlechter als die intraassay-Präzision und sie zeigt keine Abhängigkeit von der Bilirubin-Konzentration (Tab. 4 und 5).

Schlußfolgerungen

Bei der Berechnung von Wiederfindung und interassay-Präzision über alle in dieser Untersuchung gemessenen Poolserumproben, denen keine störenden Komponenten zugesetzt worden sind, ergibt sich für Digoxin eine Wiederfindung von $97,2 \pm 14,6\%$ ($n = 45$) mit einem inter-

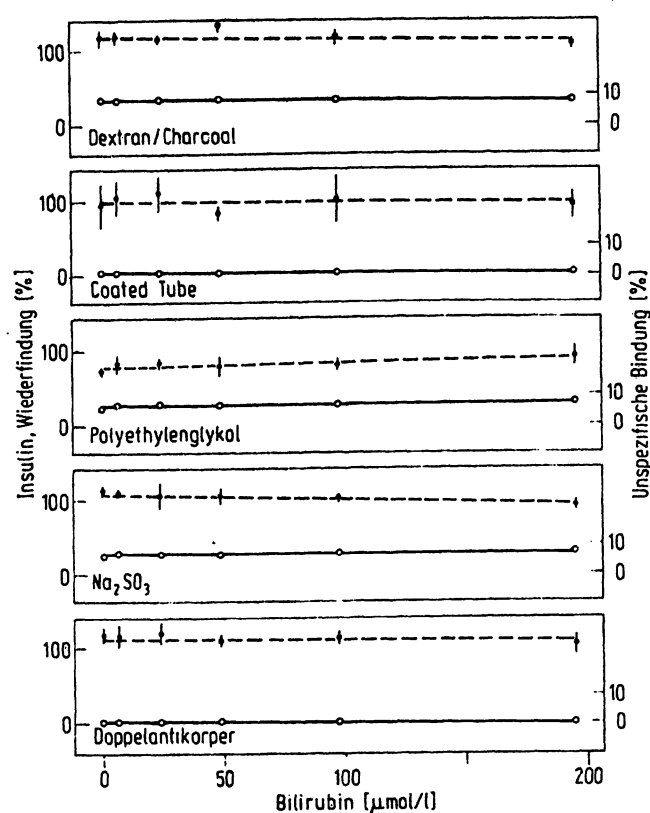


Abb. 8. Wiederfindung ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) und unspezifische Bindung (\bar{x} aus $n = 3$) für fünf Trenntechniken bei der radioimmunologischen Insulin-Bestimmung in Abhängigkeit von der Bilirubin-Konzentration.

linke Ordinate: % Wiederfindung (●)
rechte Ordinate: % unspezifische Bindung (○)
Abszisse: Bilirubin-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ Testansatz zugesetzt

assay-Variationskoeffizienten von 15,1% sowie für Insulin eine Wiederfindung von $98,5 \pm 12,8$ ($n = 60$) mit einem interassay-Variationskoeffizienten von 13,0%.

Diese Variationskoeffizienten setzen sich aus intra- und interindividueller Varianz des/der Untersucher (unterschiedliche Bearbeiter im cross-over-Verfahren), Präzision in der Serie und Präzision von Tag zu Tag sowie der interassay-Präzision zusammen und beinhalten somit alle auch bei Interlaboratoriums-Vergleichen bzw. Ringversuchen auftretenden Einflüsse mit Ausnahme der weitestmöglichen Konstanz und Vergleichbarkeit der Reagenzien und der Standardisierung der Durchführung. Der Vergleich mit der bei Hämolyse (bei der Insulin-Bestimmung in Gegenwart von N-Ethylmaleinimid), Urämie und Hyperbilirubinämie ermittelten interassay-Präzision mit Variationskoeffizienten zwischen 10 und 20% zeigt, daß diese Faktoren die interassay- (Interlaboratoriums-) Präzision nur unwesentlich beeinflussen und offensichtlich nicht zu der schlechteren Präzision beitragen, wie sie aus Interlaboratoriums- bzw. interassay-Untersuchungen bei radioimmunologischen Verfahren bekannt ist (2, 7, 8, 19–21). Die Ursachen hierfür liegen in der Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten der in Tabelle 1 genannten variablen Faktoren, deren gegenseitige Einflüsse zu untersuchen im einzelnen unmöglich ist. Insofern bieten das WHO-Programm oder analog konzipierte externe Qualitätskontroll-Untersuchungen wahrscheinlich den erfolgversprechendsten Weg, eine Verbesserung der Zuverlässigkeit radioimmunologischer Verfahren zu erreichen. Unterstützende Maßnahmen wie die systematische Untersuchung selektierter (potentieller) Störfaktoren sind hierbei geeignet, grobe Störeinflüsse zu erkennen und während der Entwicklung robuster Referenzmethoden rechtzeitig berücksichtigen zu können.

Literatur

- Röhle, G., Breuer, H. & Oberhoffer, G. (1975) Dtsch. Ärztebl. 72, 883–886.
- Breuer, H., Jungblut, D., Marschner, I., Röhle, G., Scriba, P. C. & Wood, W. G. (1978) in: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1977, Vol II, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 81–89.
- Röhle, G. & Breuer, H. (1978) Horm. Res. 9, 450–454.
- v. Borovitzky, K.-G., v. Klein-Wisnberg, A., Merten, R., Merten, U. P. & Schumann, V. (1976) in: Excerpta Medica International Congress Series No. 384, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, pp. 235–263.
- Breuer, H. & Siekmann, L. (1978) Endokrinologie-Informationen 2, 8.
- Wood, W. G. (1977) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 261–266.
- Marschner, I., Bottermann, P., Erhardt, F., Linke, R., Löffler, G., Maier, V., Schwandt, P., Vogt, W. & Scriba, P. C. (1974) Horm. Metab. Res. 6, 293–296.
- Marschner, I., Biro, G., Erhardt, F. W., Scriba, P. C. & Weiniges, K. (1975) Informationsblatt der Deutschen Diabetes-Gesellschaft Nr. 3, 1–9.
- Erhardt, F., Marschner, I., Pickardt, R. C. & Scriba, P. C. (1973) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 11, 381–387.
- Marschner, I., Erhardt, F. W. & Scriba, P. C. (1976) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 345–351.
- Horn, K., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1976) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 353–360.
- Wood, W. G., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1978) in: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1977, Vol II, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 127–139.
- Erhardt, F. W. & Scriba, P. C. (1974) Ärztl. Lab. 20, 191–198.
- Wood, W. G., Bauer, M., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1980) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 183–192.
- Wood, W. G., Bauer, M., Horn, K., Marschner, I., van Thiel, Dagmar, Wachter, Christine & Scriba, P. C. (1980) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 511–519.
- Cresswell, M. A., Hall, P. E. & Hurn, B. A. L. (1978) in: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1977, Vol II, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 149–157.
- Hall, P. E. (1979) J. Steroid Biochem. 11, 113–116.
- Hall, P. E. (1978) Horm. Res. 9, 440–449.
- Dwenger, A., Friedel, R. & Trautschold, I. (1978) in: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1977,

- Vol II, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 141–148.
20. Fast, D. M., Hannon, W. H., Burtis, C. A. & Bayse, D. D. (1980) *Clin. Chem.* 26, 480–486.
21. Hansell, J. R. (1979) *Am. J. Clin. Pathol.* 72, 341–345.
22. Bergdahl, B., Dahlström, G., Molin, L. & Bertler, A. (1979) *Acta Pharmacol. Toxicol.* 45, 66–72.
23. Mitsuma, T., Colucci, J., Shenkman, L. & Hollander, C. S. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 2107–2113.
24. Zijlstra, W. G. & Kampen, E. J. van (1960) *Clin. Chim. Acta* 5, 719–726.
25. Zijlstra, W. G. & Kampen, E. J. van (1962) *Clin. Chim. Acta* 7, 96–99.
26. Marschner, I., Erhardt, F. & Scriba, P. C. (1974) in: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, Vol I, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 111–122.
27. Marschner, I., Herndl, R. & Scriba, P. C. (1980) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 105–109.
28. Dwenger, A., Tost, P. & Trautschold, I. (1977) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 593–602.
29. Chandler, M. L. & Varandani, P. T. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 286, 136–145.
30. Ukena, D., Dwenger, A. & Trautschold, I. (1979) Berichtband der 14. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Freiburg 1979, C 25.
31. Hunter, W. M. & McKenzie, I. (1979) *Ann. Clin. Biochem.* 16, 131–146.

Dr. rer. nat. Alex Dwenger
Medizinische Hochschule Hannover
Zentrum Biochemie
Abteilung Klinische Biochemie
Karl-Neuberg-Allee 9
D-3000 Hannover 61